

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

R5～7 年度終了報告書

家庭用品中有害物質の試験法及び規制基準設定に関する研究

未規制物質の分析法と実態に関する研究

研究分担者 河上強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

研究協力者 森葉子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 研究員

研究協力者 田原麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

要旨

本研究では、検討対象物質選定スキームにより選定されたポリヘキサメチレンビグアナイド（Polyhexamethylene biguanide: PHMB）について、曝露情報の収集に向けた分析法開発のため、分光分析法及びクロマトグラフィー法の検討を行った。分光分析法では、Eosin Y を用いた蛍光分析及び nioxime を用いた分光分析を実施し、前者は感度や再現性の面で分析法としての採用は難しいと考えられた。後者では、定量性を確認したことから、CAS RN®の異なる PHMB 間での比較や、共存物質の影響を評価する必要があると考えられた。クロマトグラフィー法では、アミノプロピルカラムを分離に用い、高速液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出器にて測定した際には、クロマト上に3つのピークが確認され、用量依存的な傾向から、それらは PHMB に由来すると考えられた。また、ポリヘキサメチレングアニジンやジデシルジメチルアンモニウムクロライド等ではそれらのピークは確認されなかったことから、PHMB とそれ以外の化合物とを区別できる可能性が示唆された。一方で、同一濃度で CAS RN®の異なる PHMB を比較すると、各ピーク強度に差が認められた。また、これらのピークについて、LC-MS 分析を行ったところ、PHMB に由来すると推定される化合物が検出された。一方で、その検出傾向は CAS RN®の違いにより異なっていた。そのため、各 CAS RN®の PHMB 間で、少しずつ構造や分子量分布等が異なっている可能性が示唆された。今後は、異なる CAS RN®間での定量性の差異や、調査対象となる除菌剤等における共存物質の PHMB 分析への影響を評価すると共に、必要に応じて抽出・精製方法の検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

我が国では、家庭用品を保健衛生上の見地から安全なものにすることを目的として、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（家庭用品規制法）」¹⁾が存在し、対象家庭用品に含まれる 21 種類の有害物質群の含有量や溶出量について基準が定められている。この有害物質群の多くは、昭和 49 年～昭和 58 年にかけて指定されており、それ以降では平成 16 年施行の木材防腐剤中の 3 種の多環芳香族炭化水素類（ジベンゾ[a,h]アントラセン、ベンゾ[a]アントラセン、ベンゾ[a]ピレン）及び平成 28 年施行のアゾ化合物の 4 物質群である。一方、時代の変遷とともに、新たな形態の家庭用品や化学物質が開発され、それらの使用による健康被害が生じる可能性が考えられるが、有害物質としての指定を検討すべき物質（以下「検討対象物質」という。）の明確な選定基準及び方法は定められていなかった。そこで、先行研究（19KD2001）²⁾では検討対象物質の選定方法のあり方を提案し、有識者検討会を経て、令和 5 年度家庭用品安全対策調査会に検討対象物質選定スキーム（以下「選定スキーム」という。）として提案され、令和 6 年度家庭用品安全対策調査会で長期影響の観点からの検討対象物質の選定スキームが了承された³⁾。そして、本研究班において、検討対象物質のリスク管理に資する曝露及び有害性情報の収集を開始した。本分担研究では、選定スキームにより選定された物質のうち、ポリヘキサメチレンビグアナイド（Polyhexamethylene biguanide: PHMB）について、曝露情報の収集に向け、分析法

の検討を行ったので報告する。

PHMB はビグアナイド構造を含む繰り返し単位を有する陽イオン系ポリマーであり、抗菌・除菌等の名目で家庭用品に使用されている。ポリマーであるため、単一構造ではなく分子量分布に幅があり、塩形態の違いも含めて複数の CAS RN[®]が存在する化合物である。その代表的な構造式を図 1 に示した。欧州化学品庁 (ECHA) が所管する殺生物剤規則 (BPR) では、殺生物剤のリスク評価を行っているが、PHMB については十分に妥当性のある分析法は存在していないとされている⁴⁾。これまでに、tetrabromofluorescein (Eosin Y) や nioxime を用いた分光分析法⁵⁻⁸⁾や、高速液体クロマトグラフ (HPLC) で分離し、フォトダイオードアレイ検出器 (PDA)⁹⁻¹²⁾及び質量分析計 (MS)^{11,13)}を用いたクロマトグラフィー法が報告されている。そこで本研究では、既報の分析法の確認と、HPLC による分析時には CAS RN[®]の異なる PHMB の分析結果の比較を行った。さらに、PHMB と構造が類似しており、韓国で発生した加湿器用殺菌剤による肺障害の原因物質として報告¹⁴⁾されている、ポリヘキサメチレングアニジン (PHMG) 及びオリゴ (2- (2-エトキシ) エトキシエチルグアニジン (PGH)、並びに陽イオン界面活性剤であるジデシルジメチルアンモニウムクロライド (DDAC) 及び塩化ベンザルコニウム (BAC) の影響についても検討を行った。

B. 研究方法

B1. 試薬類

PHMB は CAS RN[®]の異なるものを複数

購入した。具体的には、CAS RN[®] 32289-58-0 を Matrix Scientific 社、CAS RN[®] 27083-27-8 を Santa Cruz Biotechnology 社、CAS RN[®] 133029-32-0 を Medchemexpress 社からそれぞれ購入した。また、PHMB との比較対象のため、PHMG は Ochem 社製、PGH は BOC Science 製、DDAC は Santa Cruz Biotechnology 社を購入した。BAC については炭素鎖 14 のものを東京化成工業から購入した。また、PHMB 以外の化合物の構造式を図 2 に示した。

Eosin Y 及び nioxime は東京化成工業製、塩化ニッケル (II) 六水和物、グリシン、塩酸及びアンモニア水は富士フイルム和光純薬製特級試薬、酢酸アンモニウムはメルク製 HPLC 用、酢酸及びエタノールは関東化学製の特級及び残留農薬・PCB 分析用 300 倍濃縮検定品、塩化ナトリウムはシグマアルドリッチジャパン製の特級試薬をそれぞれ用いた。アセトニトリルは富士フイルム和光純薬製の HPLC 用及び LC-MS 用を用いた。実験に使用した水は超純水製造装置 Milli-Q Advantage A10 (日本ミリポア社製) を用いて作製した。

グリシン緩衝液は、グリシン及び塩化ナトリウムをそれぞれ 0.1 mol/L となる水溶液を作成後、塩酸で pH3.5 に調製したものをを用いた。ニッケル溶液は、塩化ニッケル (II) 六水和物 80 mg を 50 mL の水に溶解し、15 mL の 28% アンモニア水を加えた後、水で 100 mL に定容した。Nioxime 溶液は、nioxime 400 mg を 100 mL の水に溶解したものをを用いた。

B2. 分析方法

B2.1 分光分析

B2.1.1 Eosin Y による蛍光分析

PHMB 水溶液 5 mL、グリシン緩衝液 5 mL 及び 0.05% Eosin Y エタノール溶液を 0.5 mL 混ぜ合わせ、5~10 分放置した。既報⁵⁻⁷⁾では、波長 550 nm の吸光度を分光光度計で測定するが、本研究では日立製作所製の分光蛍光光度計 F-7000 にて、スペクトル測定を行った。

B2.1.2 Nioxime による分光分析

PHMB 水溶液 50 mL にニッケル溶液 1 mL を加え攪拌後、3 分静置した。その後、nioxime 溶液を 1 mL 添加し攪拌後、波長 550 nm の吸光度を日立製作所製の分光光度計 U-5100 にて測定した。

B2.2 クロマトグラフィー

B2.2.1 HPLC-PDA/ELSD

HPLC は、島津製作所社製 LC-30AD (ポンプ)、SIL-30AC (オートサンプラ)、CTO-30A (カラムオーブン) 及び SPD-M30A (PDA) から構成される NexeraX2 システムを用いた。既報¹²⁾を参考に、分離カラムにはアミノプロピル基を有する UK-Amino UP (粒子径 3 µm、内径 2.0 mm、長さ 100 mm、インタクト製) を用いた。移動相には、酢酸で pH4.3 に調製した 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (A 液) 及びアセトニトリル (B 液) を用いた。グラジエント条件は、B 液 (90%) で 2 分間保持後、0.5 分で 98% として 5 分間保持した。その後、2 分間で B 液 25% とした後、5.5 分間保持した。流速は 0.8 mL/min、オーブン温度は 30°C、注入量は 20 µL、PDA の測定範囲は 190~700 nm で測定波

長は 235 nm とした。

B2.2.2 LC-HRMS

HPLC-PDA を用いた分析で検出したピークの確認のため、ThermoFisher Scientific 製の Vanquish-Orbitrap Exploris 120 を用いた定性分析を行った。HPLC 条件は流速を 0.2 mL/min、注入量を 5 μ L、オーブン温度を 40°C とし、移動相及びグラジエント条件は HPLC-PDA 分析と同じとした。ポジティブ及びネガティブモードで、data dependent scan (DDS) 測定を行った。その際、分解能 60000、スキャン範囲は m/z = 40~600 及び 200~3000 とした。

C. 結果及び考察

C1.1 分光分析

C1.1.1 Eosin Y による蛍光分析

既報⁵⁻⁷⁾による Eosin Y を用いた PHMG 分析法では、反応後の溶液について 550 nm 前後の吸光度を用いて定量している。一方で、PHMB を同法で分析すると、紫外可視吸光スペクトルは PGH や PHMG と類似して区別がつかないことや、DDAC 及び BAC についても極大波長は異なるものの、PHMB との混合溶液では妨害となり得ることが報告⁷⁾されている。そこで、Eosin Y は蛍光を有することから、PHMB、PHMG、PGH、DDAC 及び BAC との反応後の蛍光スペクトルを比較した。その結果を図 3 に示した。その結果、PHMB では励起波長 250~260 nm、蛍光波長 360~370 nm 付近にピークが認められた。一方で、その他の化合物ではその位置にピークは認められなかった。しかしながら、感度が低いうえに、再現性も悪いことから、

紫外可視吸光スペクトル法の代替分析法としての利用可能性は高くないと考えられた。

C1.1.2 Nioxime による分光分析

PHMB は塩基性条件下でニッケルと無色透明な錯体を、nioxime はニッケルとピンク色の錯体を形成する (図 4)。この反応を利用して、はじめに PHMB とニッケルとの錯体を形成させ、その後、余剰のニッケルと nioxime とを反応させ、ニッケル-nioxime 錯体の生成量から、PHMB の生成量を算出する方法が報告⁸⁾されている。そこで、同法を用いて定量分析を検討したところ、10~50 μ g/mL の範囲で直線性のある検量線が作成できた (図 5)。ただし、既報の濃度では PHMB が低濃度の場合に、ニッケル-nioxime 錯体の凝集・沈殿が認められたことから、ニッケル溶液の濃度等を検討する必要があると考えられた。また、今回は CAS RN[®]が 133029-32-0 の PHMB を供試したが、その他の CAS RN[®]の PHMB についても試験し、相互に定量値等を比較することで、定量評価の有用性を検証する必要がある。さらに、既報⁸⁾では DDAC や BAC の様な四級アンモニウム系化合物の影響は少ないことが報告されているが、構造類似の PHMG や PGH については検討されていない。そのため、これらの化合物や、実際の除菌剤等における共存物質の影響を評価する必要がある。

C1.2 クロマトグラフィー

C1.2.1 HPLC-PDA

CAS RN[®]の異なる PHMB について、

HPLC-PDA で測定した結果、保持時間が 0.4 分 (Peak A)、10 分 (Peak B) 及び 16 分 (Peak C) 付近に 3 つのピークが確認できた (図 6)。この 3 つのピークについて、紫外可視吸収スペクトルを確認すると、235 nm 付近にショルダーもしくは極大吸収が確認できた。既報^{9,11,12)}では、220 nm や 235 nm を測定に使用しており、本研究では 235 nm を測定に使用した。また、シアノプロピル基やオクチル基を有するカラムによる PHMB の分析では、ピークは一つしか検出されていない^{9,10)}。一方で、オクタデシル基を有するカラムによる分析では、複数のピークが確認されており、その中で強度の強いピークを選び、定量を実施していた¹¹⁾。一方、本研究と同様にアミノプロピルカラムを用いた報告¹²⁾では、一つのピークを用いて定量しており、それ以外のピークの存在については触れられていない。そこで、これらのピークが PHMB に由来するか確認するため、濃度を変えて測定したところ、Peak A 及び B では 10~250 µg/mL、Peak C では 25~250 µg/mL の範囲で、用量依存的に面積が増加し、検量線が作成できた (図 7)。そのため、これらのピークは PHMB に由来すると考えられた。

PHMG、PGH、DDAC 及び BAC については、PHMG や PGH で小さなピークが認められたが、PHMB と比べて非常に小さく、PHMB 分析時のキャリーオーバーの可能性が考えられた (図 8)。また、それ以外の化合物では PHMB で認められたピークは検出されなかった。そのため、HPLC-PDA 分析において、PHMB とそれ以外の化合物とを区別できる可能性が示

唆された。一方で、同一濃度で CAS RN[®] の異なる PHMB を比較すると、各ピーク強度に差が認められた (図 6)。その理由が、標準品の純度の違いに起因するのか、ポリマーの構造内の差異によるものかは、検討が必要と考えられた。

C1.2.2 LC-MS

HPLC-PDA で検出されたピークについて、用量応答性が認められたことから、PHMB に由来すると考えられたが、どのような化合物か検討するため、LC-MS による定性分析を実施した。既報¹³⁾による LC-MS を用いた PHMB の分析では、複数の化合物が検出されており、それらを参考に解析した結果、7 化合物が推定された (化合物①~⑦) (図 9)。これらの化合物は、PHMB の基本構造を含んでおり、このことから HPLC-PDA で検出された 3 つのピークが PHMB に由来すると考えられた。一方で、CAS RN[®]が異なる PHMB 間で比較すると、例えば化合物①は CAS RN[®] 27083-27-8 で保持時間 2.94 分に大きなピークとして検出された一方で、残りの 2 物質では、保持時間 11.37 分の方が強度は強い傾向を示した (図 10)。化合物②、④、⑥及び⑦については、CAS RN[®] 27083-27-8 からは検出されず、残りの 2 物質からは検出された。また、CAS RN[®] 32289-58-0 及び CAS RN[®] 133029-32-0 の間では、化合物①~⑦の検出傾向は似ているものの、一部では差異が認められた。そのため、本研究で購入した CAS RN[®]が異なる PHMB については、それぞれ少しずつ構造や分子量分布等が異なっている可能性が示唆された。

D. まとめ

本研究では、選定スキームにより選定された物質のうち PHMB について、分光分析法及びクロマトグラフィー法の検討を行った。分光分析法では、Eosin Y を用いた蛍光分析及び nioxime を用いた分光分析を実施し、前者は感度や再現性の面で分析法としての採用は難しいと考えられた。後者では、定量性は確認できたことから、今後は異なる CAS RN[®]間での比較や、共存物質の影響を評価する必要がある。クロマトグラフィー法では、アミノプロピルカラムを用いることで、HPLC-PDA 分析では 3 つのピークが確認され、用量依存的な傾向から、それらは PHMB に由来すると考えられた。また、PHMG や DDAC 等ではそれらのピークは確認されなかったことから、PHMB とそれ以外の化合物とを区別できる可能性が示唆された。一方で、同一濃度で CAS RN[®]の異なる PHMB を比較すると、各ピーク強度に差が認められた。また、これらのピークについて、LC-MS 分析を行ったところ、PHMB に由来すると推定される化合物が検出された一方で、その検出傾向は CAS RN[®]の違いにより異なっていた。そのため、各 CAS RN[®]の PHMB 間で、少しずつ構造や分子量分布等が異なっている可能性が示唆された。今後は、各 CAS RN[®]間での定量性の差異や、調査対象となる除菌剤等における共存物質の PHMB 分析への影響を評価すると共に、必要に応じて抽出・精製方法の検討が必要と考えられた。

E. 研究発表

E1. 論文発表

なし

E.2 学会発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 引用文献

- 1) 昭和 48 年法律第百十二号: 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律
- 2) 五十嵐良明: 家庭用品規制法における有害物質の指定方法のあり方に関する研究, 令和 3 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 総合報告書
- 3) 厚生労働省医薬局医薬品審査管理課化学物質安全対策室: 家庭用品の化学的安全性確保に向けた検討対象物質選定スキームとその後の進め方に関する考え方, <https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/001317561.pdf>
- 4) European Chemical Agency (ECHA): Biocidal Products Committee opinions on active substance approval, https://echa.europa.eu/regulations/biocidal-products-regulation/approval-of-active-substances/bpc-opinions-on-active-substance-approval?diss=true&search_criteria_ecnu

- mber=687-569-4&search_criteria_casnumber=32289-58-0&search_criteria_name=Poly%28iminoimidocarbonyliminoimidocarbonyliminohexamethylene%29%2Chydrochloride+%288CI%29
- 5) Chang HR, Yang KW, Kim YH: Environmental risk assessment of polyhexamethyleneguanidine phosphate by soil adsorption/desorption coefficient, Korean J Environ Agric, 25, 365-370, 2006.
 - 6) Monakhova YB, Kuballa T, Leitz J, Lachenmeier DW.: Determination of diethyl phthalate and polyhexamethylene guanidine in surrogate alcohol from Russia, Int J Anal Chem, 704795, 2011.
 - 7) 河上強志: 家庭用除菌剤等の市場流通品の実態調査並びに国内外の健康被害症例報告及び諸外国の規制状況調査, 令和 2 年度厚生労働科学特別研究 分担報告書
 - 8) Rowhani T, Lagalante AF.: A colorimetric assay for the determination of polyhexamethylene biguanide in pool and spa water using nickel-nioxime, Talanta, 71, 964-970, 2007.
 - 9) Küstersa, M.; Beyera, S.; Kutschera, S.; Schlesingera, H.; Gerhartz, M.: Rapid, simple and stability-indicating determination of polyhexamethylene biguanide in liquid and gel-like dosage forms by liquid chromatography with diode-array detection, J Pharm Anal, 3, 408-414, 2013.
 - 10) Lucas AD, Gordon EA, Stratmeyer ME.: Analysis of polyhexamethylene biguanide in multipurpose contact lens solutions, Talanta, 80, 1016-1019, 2009.
 - 11) Thompson BL, Samant VN, Wei X, David FDC, Edmunds CE, Wheeler JM, Phillips KS, Wheeler JF, Wheeler SK.: Analysis of polyhexamethylene biguanide and alexidine in contact lens solutions using capillary electrophoresis, ultra-performance liquid chromatography and quadrupole time of flight mass spectrometry, Talanta, 205, 120056, 2019.
 - 12) Martynov LY, Sakharov KA, Pavel'eva YI, Zvereva AS, Zaytsev NK, Skopin AY, Andreev SV.: Detection of benzalkonium chloride and polyhexamethylene guanidine hydrochloride using novel organic gel-based amperometric electrode and HILIC DAD, Microchem J, 183, 107988, 2022.
 - 13) Buchberger T, Himmelsbach H, Buchberger W.: Analysis of biocidal oligoguanidines and oligobiguanides by high performance liquid chromatography and mass spectrometry, Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 41, 1-10, 2014.
 - 14) Lee JH, Kim YH, Kwon JH.: Fatal misuse of humidifier disinfectants in Korea: importance of screening risk assessment and implications for management of chemicals in consumer products, Environ Sci Technol, 46, 2498-2500, 2012.

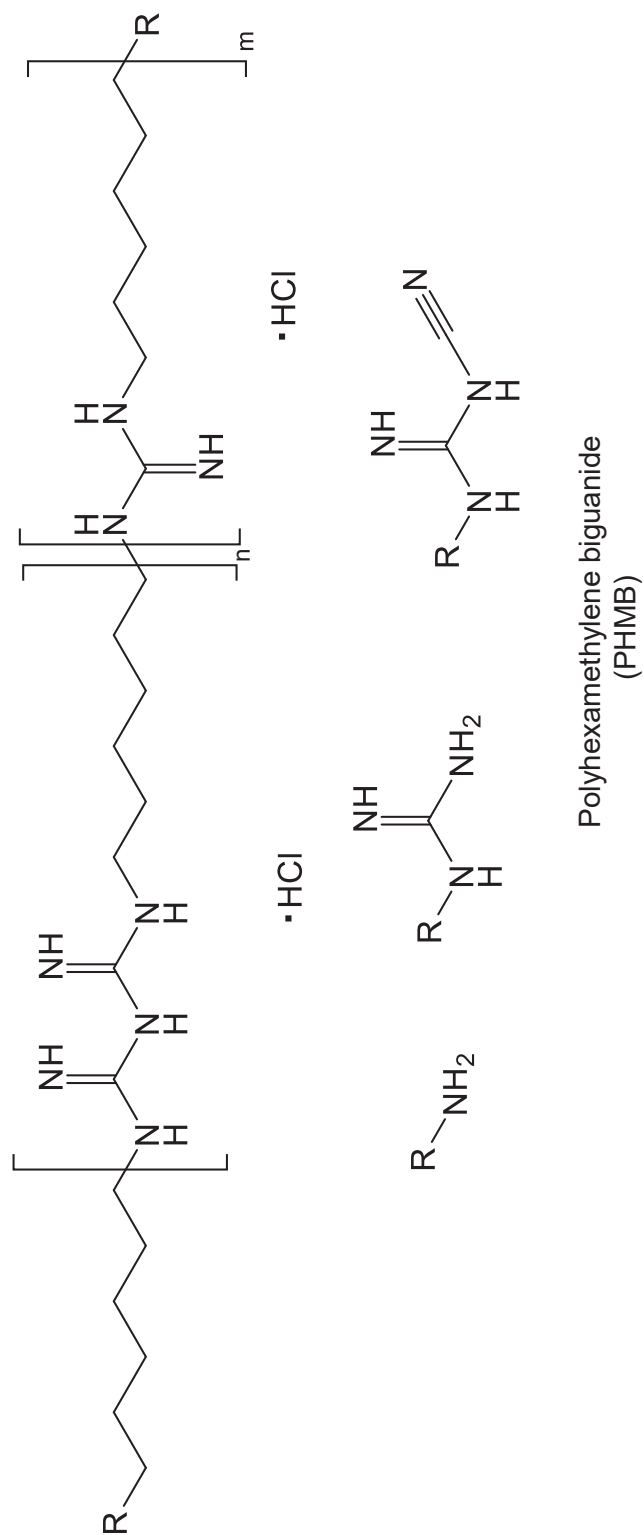


図 1. PHMB の構造式

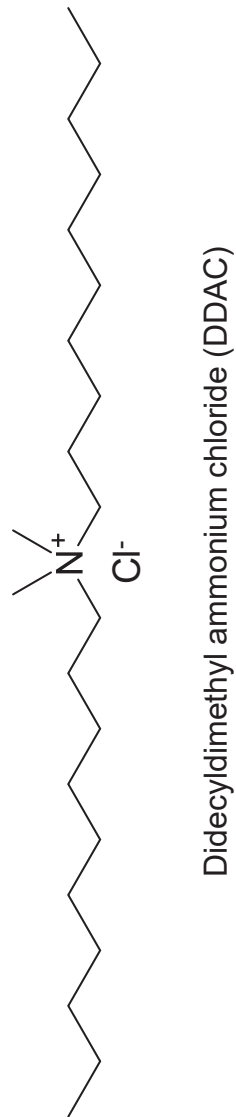
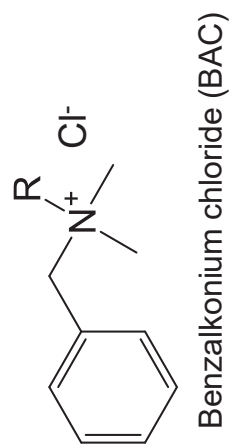
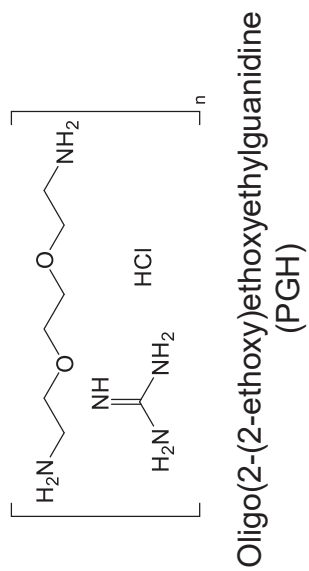
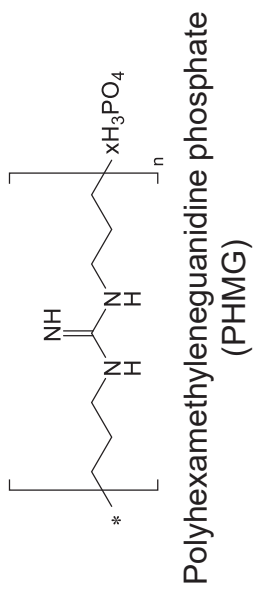


図 2. 比較検討に用いた化合物の構造式 (BAC は炭素鎖 14 を使用)

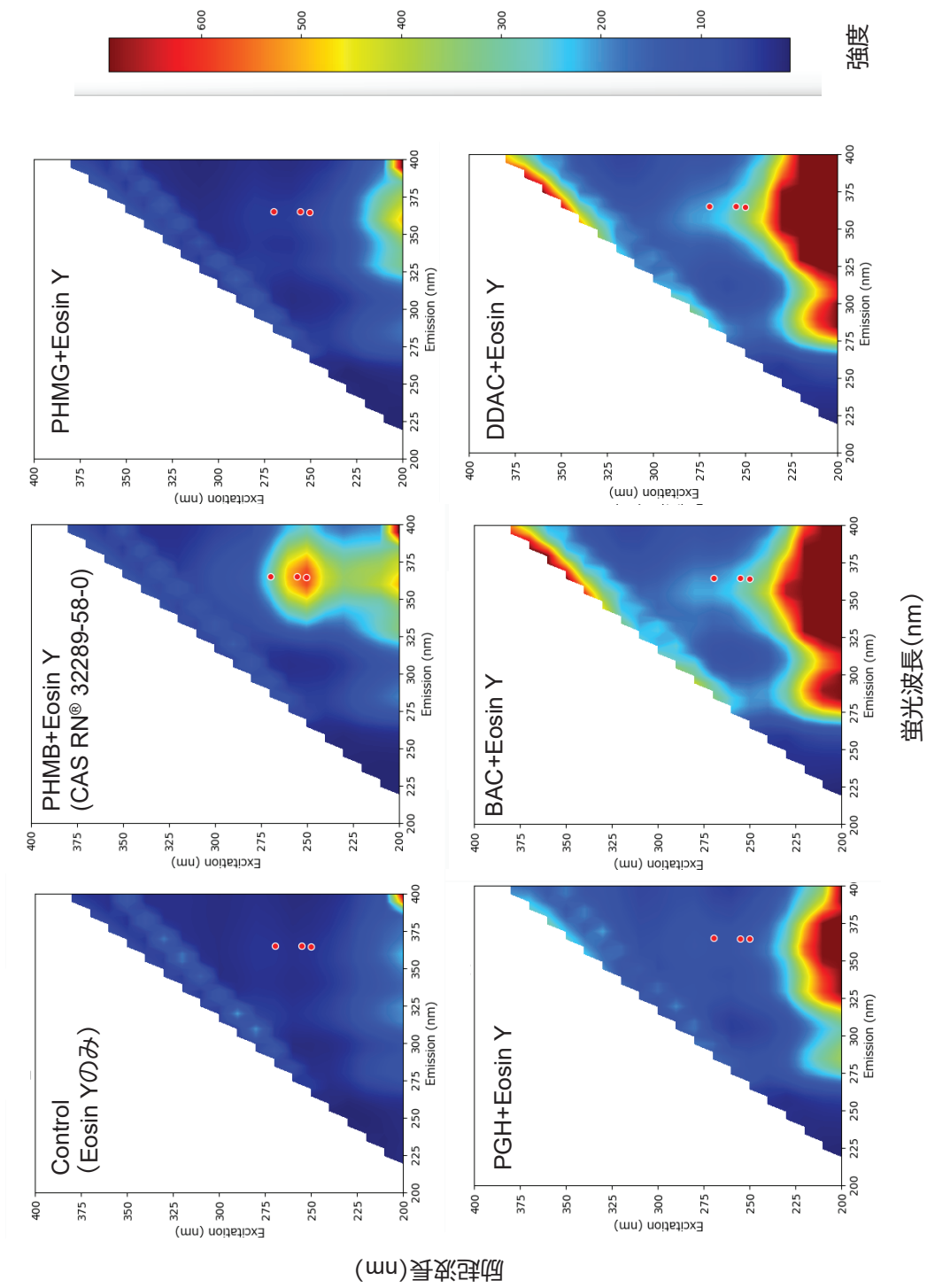


図 3. 各化合物と Eosin Y との反応後の 3 次元蛍光スペクトル

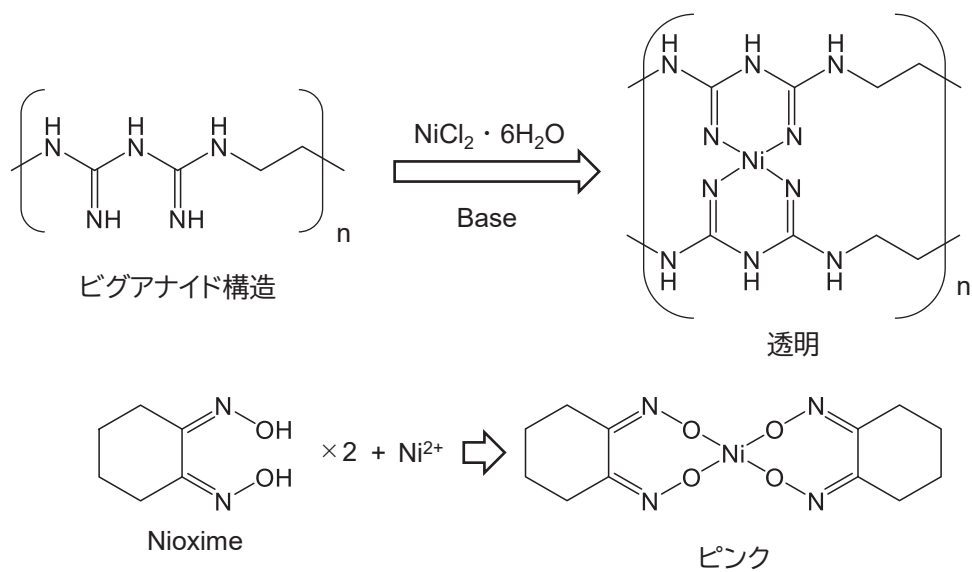


図 4. PHMB 及び nioxime とニッケルとの錯体形成反応

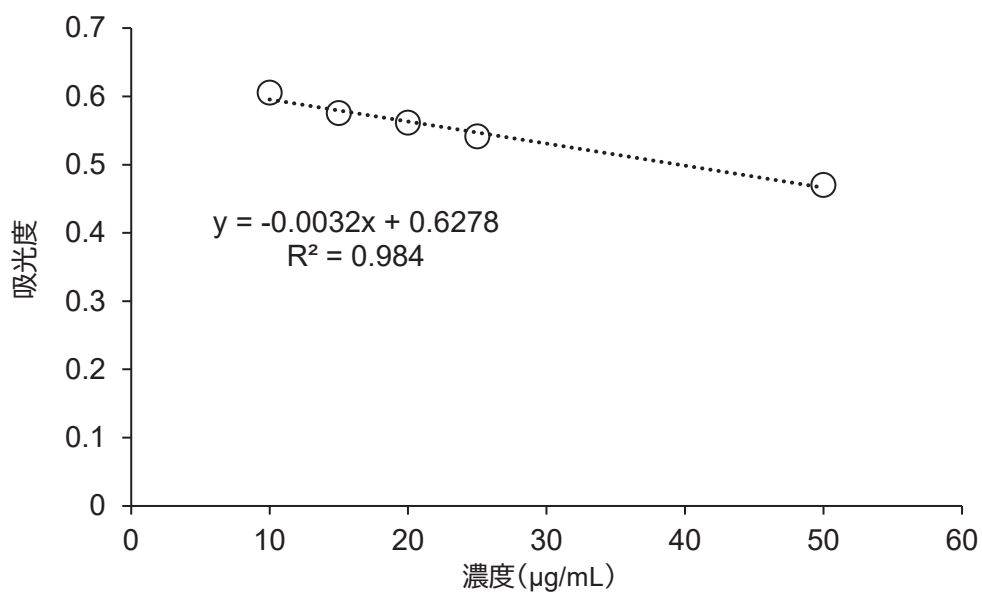


図 5. Nioxime を用いた分光分析による PHMB (CAS RN.133029-32-0) の検量線

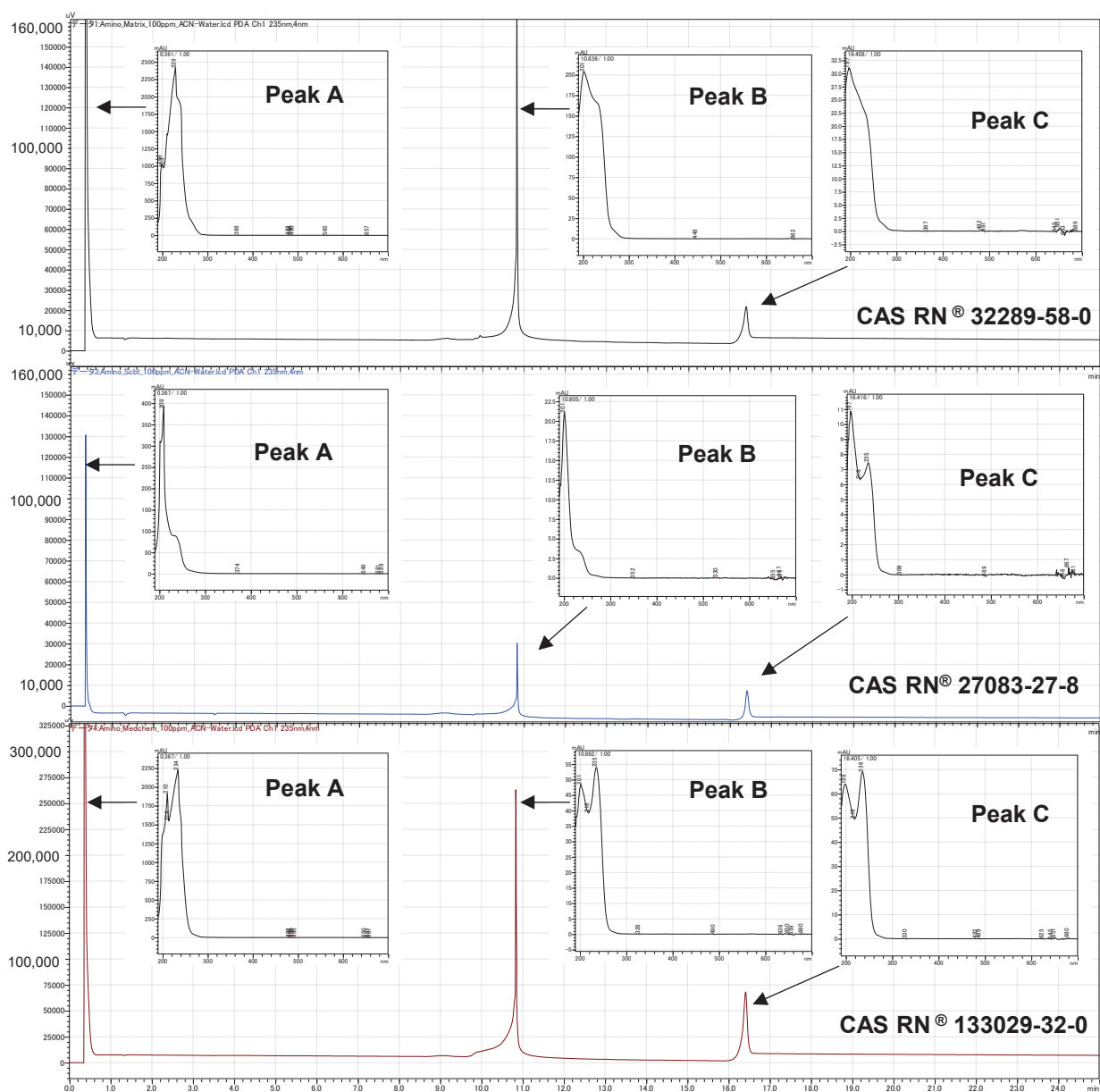


図 6. HPLC-PDA 分析による CAS RN® の異なる PHMB (100 $\mu\text{g/mL}$) のクロマトグラム ($\lambda = 235 \text{ nm}$)

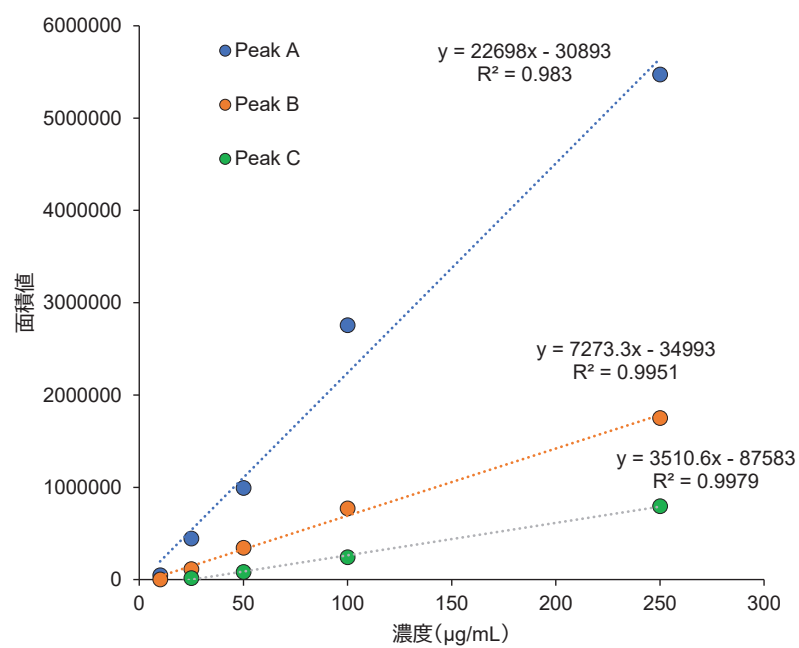


図 7. HPLC-PDA 分析で PHMB 溶液から検出された各ピークの面積値から作成した検量線
(PHMB は CAS RN[®] 32289-58-0)

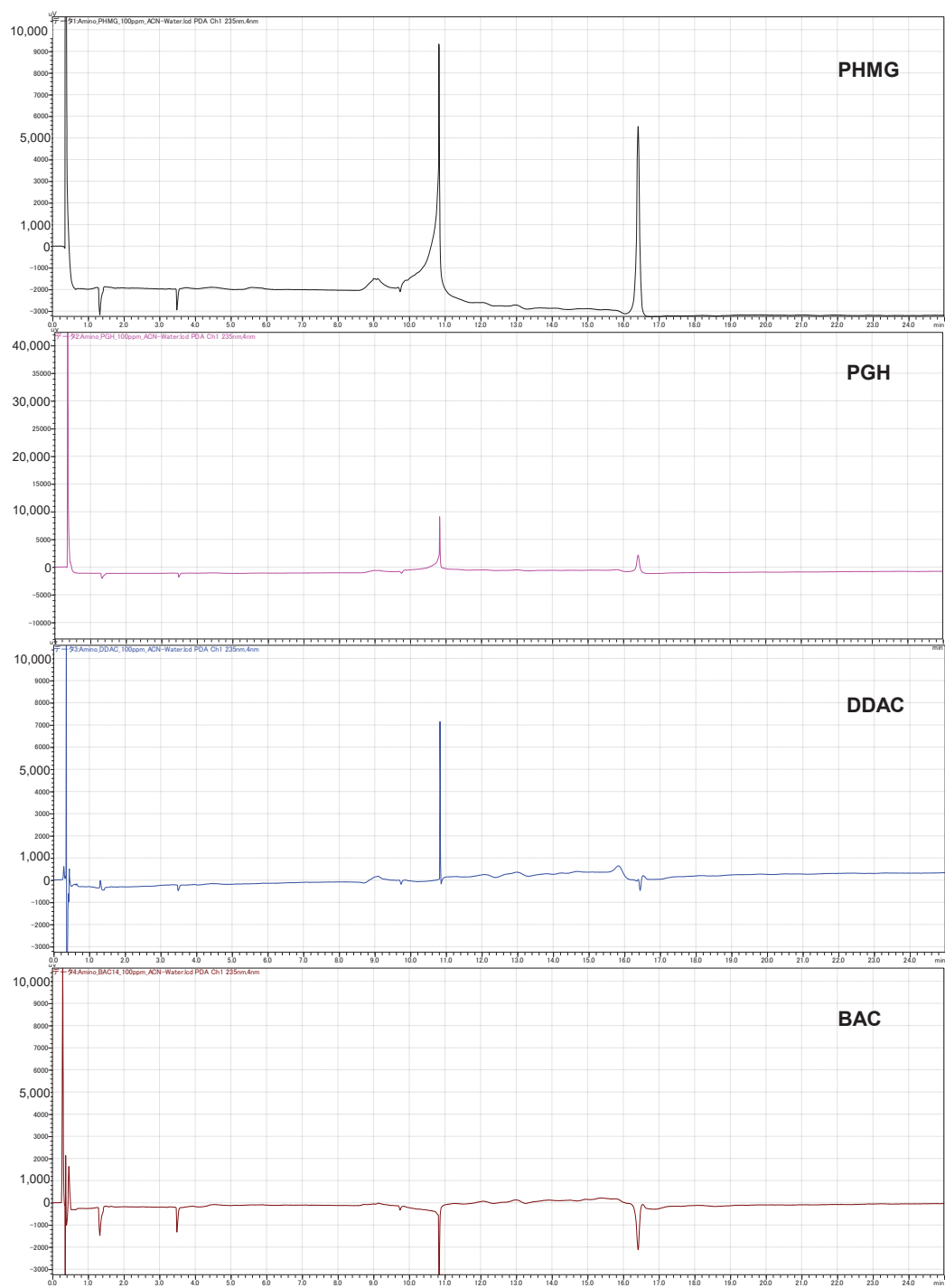
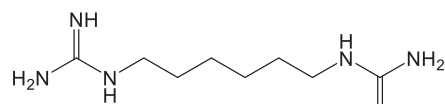


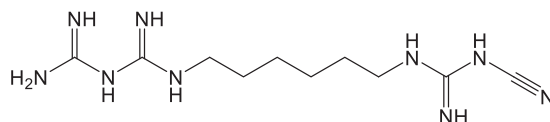
図 8. HPLC-PDA 分析による PHMG、PGH、DDAC 及び BAC の
クロマトグラム (各 : 100 $\mu\text{g/mL}$)
($\lambda=235\text{ nm}$)



化合物① C₈H₂₀N₆

[M+H]⁺

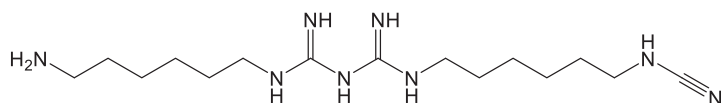
m/z = 201.1822



化合物② C₁₀H₂₁N₉

[M+H]⁺

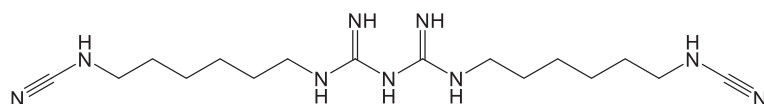
m/z = 268.1992



化合物③ C₁₅H₃₂N₈

[M+2H]²⁺

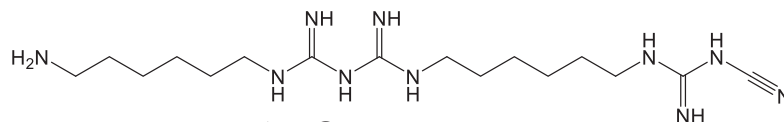
m/z = 163.1447



化合物④ C₁₆H₃₁N₉

[M+2H]²⁺

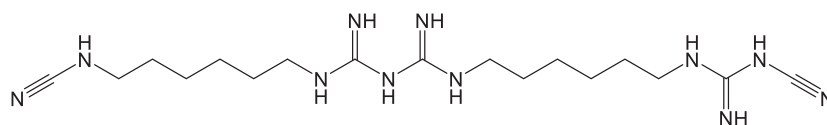
m/z = 175.6424



化合物⑤ C₁₆H₃₄N₁₀

[M+2H]²⁺

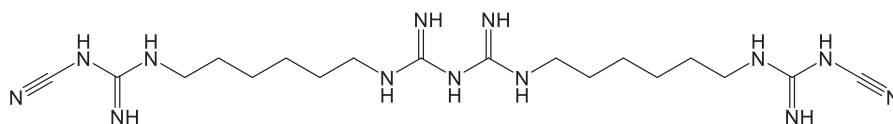
m/z = 184.1556



化合物⑥ C₁₇H₃₃N₁₁

[M+2H]²⁺

m/z = 196.6533



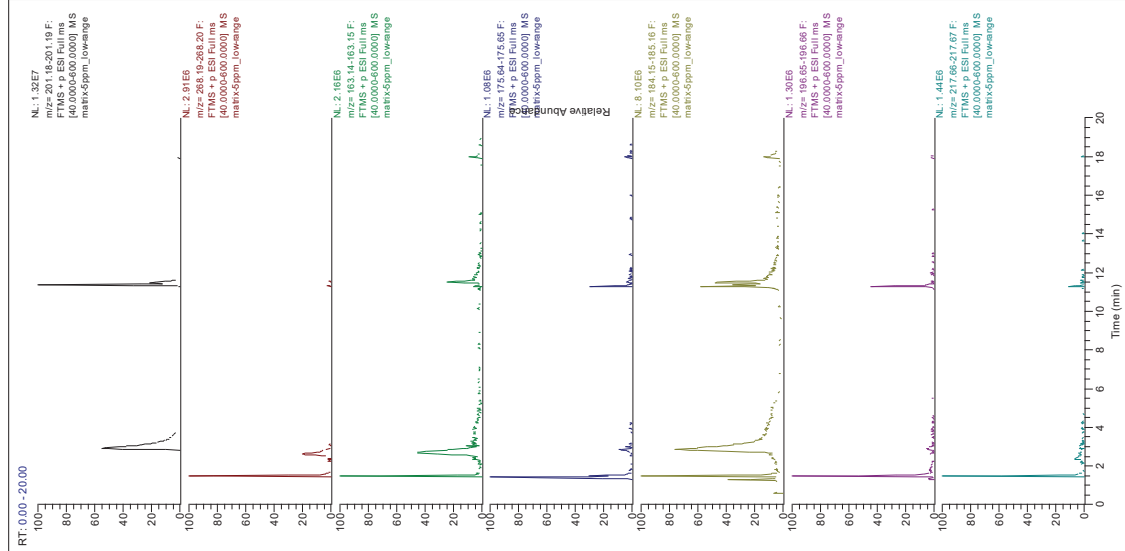
化合物⑦ C₁₈H₃₅N₁₃

[M+2H]²⁺

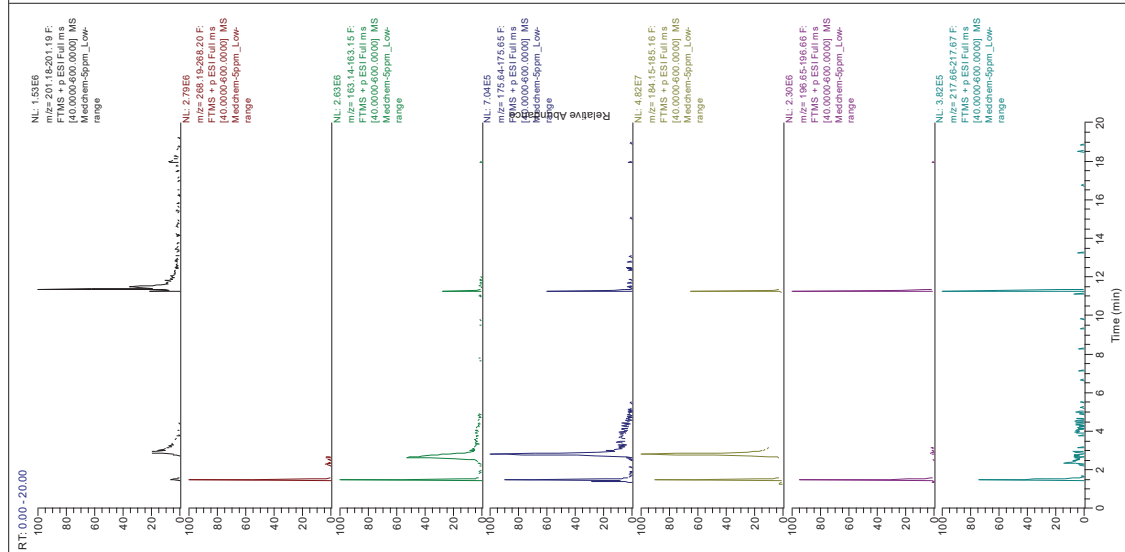
m/z = 217.6642

図 9. LC-MS 分析で PHMB 溶液から検出された化合物の推定構造 と
イオン種及び質量電荷比

CAS RN® 32289-58-0



CAS RN® 133029-32-0



CAS RN® 27083-27-8

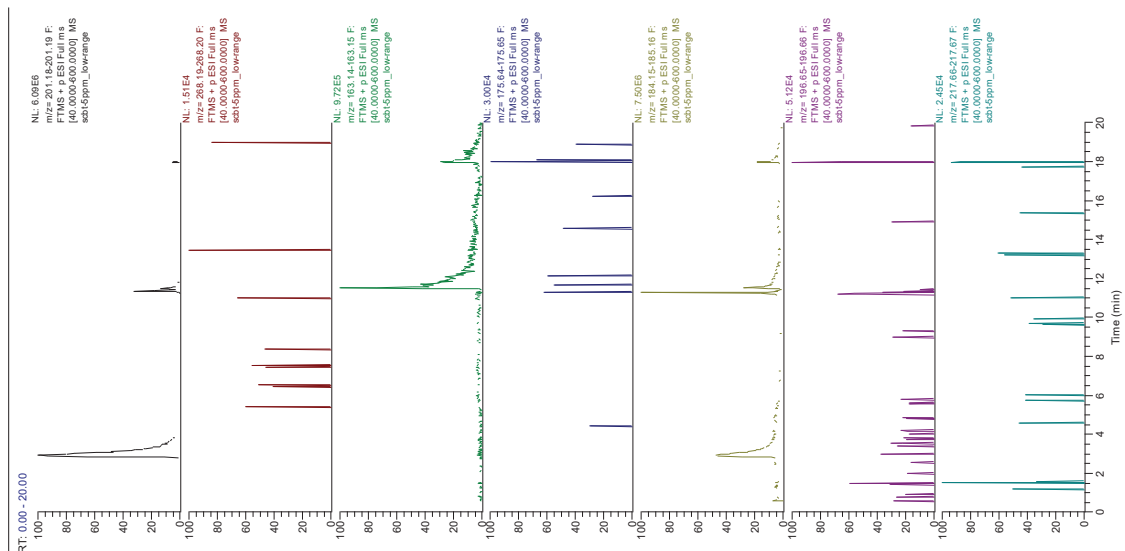


図 10.LC-MS 分析による CAS RN®の異なる PHMB (5 µg/mL) のマスクロマトグラム